

氏名（本籍）	堀之北 一郎（神奈川県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 308 号
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	脳梗塞後の <b>Progranulin</b> の病態生理学的変化と好中球エラスターゼ阻害による新たな治療戦略
論文審査委員	（主査）教授 高木 教夫 教授 田野中 浩一 教授 馬場 広子

## 論文内容の要旨

脳梗塞は種々の後遺症を引き起こすことから、要介護認定を受ける患者数が最も多い疾患である。現在、脳梗塞急性期の治療では血栓溶解薬である組織プラスミノゲンアクチベータが劇的な治療効果を示す一方で、出血等の副作用を避けるため、脳梗塞発症後の投与開始時間が制約されており、治療の対象となる患者は限られている。このため脳梗塞急性期における有効な治療薬の開発が急務とされている。

脳梗塞病態の進展と拡大は、発症早期の血液脳関門の破綻に基づくマクロファージや好中球などの脳実質内への浸潤が 1 つの要因とされている。浸潤した好中球などは、インターロイキン- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) や腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の放出により炎症を誘導し、神経細胞死やグリア細胞の活性化などに伴う脳梗塞巣の拡大に大きな影響を及ぼす。したがって、脳梗塞急性期での好中球浸潤に由来する炎症の制御は病態改善につながる重要事項と考えられる。

**Progranulin (PGRN)** は糖タンパク質成長因子の一種であり、組織修復および炎症抑制など種々の機能を有することが知られている。近年、**PGRN** が欠損した初代培養神経細胞の生存率は野生型と比べ低下することや **PGRN** 遺伝子変異は前頭側頭葉変性症の原因であることが明らかとなり、**PGRN** の神経細胞保護因子としての役割が注目されている。一方、**PGRN** が好中球エラスターゼ (NE) により切断されて生じる **granulin (GRN)** は翻って炎症を誘導することが明らかとなっている。前述した脳梗塞病態に鑑みて、**PGRN** の病態生理学的役割を明らかにすることは、新たな治療法を見出すうえで重要事項であると考えられる。

そこで本研究では、脳梗塞病態下での **PGRN** および **GRN** の役割について検討し、新たな脳梗塞治療戦略の提案を試みた。第 1 章では、ラット脳梗塞モデルおよび初

代培養ミクログリア細胞を用いて虚血性脳障害後の PGRN および GRN の病態生理学的変化について検討した。第 2 章では, oxygen-glucose deprivation (OGD) 条件下で培養した神経細胞およびグリア細胞に及ぼす選択的好中球エラスターゼ阻害薬シベレスタットおよび recombinant PGRN (rPGRN) の細胞保護効果とその機序を検討し, 第 3 章では, OGD 後の神経幹細胞増殖能および多分化能に及ぼすシベレスタットおよび rPGRN 処置の影響について検討した。

## 第 1 章 脳虚血後の PGRN および GRN の病態生理学的変化

これまでの研究で NE が PGRN を切断すること, この切断により生じる GRN は炎症を誘導することが明らかとなっており, NE は脳梗塞急性期における新たな治療標的になる可能性がある。第 1 章では, ラット脳梗塞モデルおよび初代培養ミクログリアを用いて虚血性脳障害の PGRN および GRN の病態生理学的変化について検討するとともに, NE の選択的阻害薬であるシベレスタットの PGRN 切断および炎症性サイトカイン発現に及ぼす影響と細胞障害に及ぼす効果について検討した。

はじめに, モデル動物で PGRN 量の経日的変化を検討したところ, ME 後 1 日目よりそのタンパク質量は増加し始め, 3 日目に最大となった (Fig 1)。この局在について免疫染色法を用いて検討したところ, 特に ME 群の Iba-1 陽性活性化ミクログリアで PGRN は発現していた (Fig 2)。また, OGD 処置後の初代培養ミクログリアでも同様に, 活性化ミクログリアにおいて PGRN が発現していた。さらに, NE により PGRN の切断で生じる GRN の発現について検討した結果, ME 後 1 日目からその発現が増加していた (Fig 3)。この結果は, 虚血後早期から PGRN の切断が惹起されている可能性を示している。

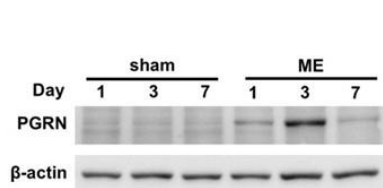


Fig. 1 Time course of changes in the levels of PGRN protein.

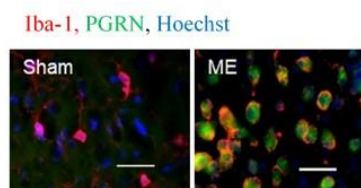


Fig. 2 Cellular localization of PGRN in the cortex.

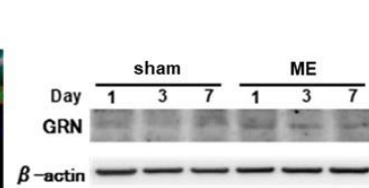


Fig. 3 Time course of changes in the levels of GRN protein.

次に好中球エラスターゼ選択的阻害薬であるシベレスタットをモデル動物に投与した結果, PGRN 量がさらに増加し, 一方で GRN 量の増加は抑制された (Fig 4)。さらにシベレスタットの投与は, 脳内に浸潤する好中球数には影響しないものの, 好中球エラスターゼ活性および炎症性サイトカインの発現を抑制するとともに, 脳梗塞後に増加する TUNEL 陽性細胞数を減少させた (Fig 5)。

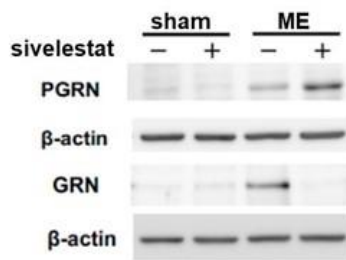


Fig. 4 Effect of sivelestat treatment on protein levels of PGRN and GRN.

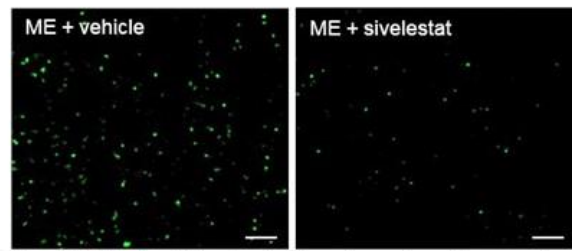


Fig. 5 Effect of sivelestat treatment on the number of TUNEL-positive nuclei.

第 1 章の結果より，脳梗塞後のシベレスタットの投与は虚血後早期の脳内好中球エラスターゼ活性を抑制することで PGRN 切断の抑制とそれに伴う GRN 産生の抑制を介した抗炎症作用を発揮することで，虚血性脳細胞障害を抑制すると示唆された。

## 第 2 章 OGD 条件下の神経細胞およびグリア細胞に対する PGRN の保護効果とその機序の解明

第 1 章では，脳梗塞後の脳実質に好中球が浸潤し，そこから分泌されたエラスターゼにより PGRN が切断されること，さらに PGRN の切断で生じた GRN が脳梗塞後早期の炎症反応や細胞傷害に関与する可能性を選択的好中球エラスターゼ阻害薬のシベレスタットを用い示した。しかし，これらの抗炎症作用や細胞保護効果がシベレスタットの直接的な効果によるものか，またはシベレスタットにより切断が抑制された PGRN による間接的な効果によるものかは明らかになっていない。そこで第 2 章では，各脳細胞に焦点をあて，OGD 条件下で培養した細胞に及ぼすシベレスタット処置および rPGRN 処置の直接効果を検討した。

OGD 処置培養神経細胞に対するシベレスタットの神経細胞保護効果は観察されず，増加した cleaved caspase-3 タンパク質量にも影響を及ぼさなかった (Fig 6A). 一方，rPGRN 処置は OGD により低下した生存率を回復させるとともに，増加した cleaved caspase-3 タンパク質量を減少させた (Fig 6B). この効果は，第 1 章で明らかにしたシベレスタット投与による TUNEL 陽性細胞数の減少効果が PGRN 切断抑制に起因することを裏付けている。

次に OGD 処置アストロサイトでの GFAP 発現量に及ぼすシベレスタットおよび rPGRN の効果を検討したところ，シベレスタットはアストロサイトの GFAP 発現量になんら影響を及ぼさず (Fig 7A), rPGRN 処置は，その発現量増加を抑制した (Fig 7B). さらに，シベレスタットは OGD 処置ミクログリアの炎症性サイトカイン mRNA 発現になんら影響を及ぼさなかったが，rPGRN 処置はその mRNA 発現を抑制

した. また, ミクログリアに対する rPGRN 処置は M1 ミクログリアのマーカーである iNOS 陽性細胞数を減少させた (Fig 8).

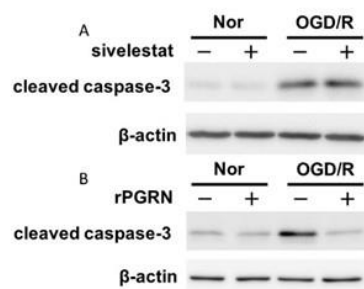


Fig. 6 Effect of sivelestat or rPGRN treatment on protein levels of cleaved caspase-3.

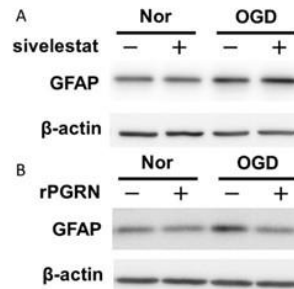


Fig. 7 Effect of sivelestat or rPGRN treatment on protein levels of GFAP.

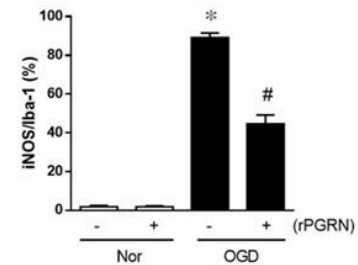


Fig. 8 Effect of rPGRN treatment on the number of iNOS-positive cells.

第 2 章の結果より, 脳梗塞後のシベレスタット投与によって得られた細胞保護効果はシベレスタットによる直接的な作用によるものではなく, 好中球エラストラーゼの阻害により切断を逃れた PGRN による間接的な寄与が大きいと示唆された. さらに, ミクログリアへの rPGRN 処置は, M1 ミクログリアのマーカーである iNOS 陽性細胞数を減少させたが, Iba-1 陽性ミクログリアの数を変化させなかったことから, PGRN がミクログリアをラミファイド型または M2 ミクログリアに極性を転換させ, 細胞保護効果の一端を担う可能性を示した.

### 第 3 章 OGD 後の神経幹細胞増殖能および多分化能に対する PGRN の効果

脳梗塞後の神経新生は一過性であり, 機能回復する十分量に達していないことが知られている. さらに, 虚血後早期に誘導される炎症反応により, 定着できる新生ニューロンはわずか数%であると考えられている. すなわち神経幹/前駆細胞 (NS/PC) を増加させ, 神経新生を継続して誘導することがこれらの問題の解決に繋がると考えられる. 第 1 章の結果より得られた虚血後早期の PGRN 切断抑制による PGRN タンパク質量の増加, 第 2 章で得られた OGD 処置神経細胞に対する rPGRN の神経保護効果およびミクログリアに対する抗炎症作用は, 脳虚血後早期の NS/PC 減少を抑制する可能性がある. そこで第 3 章では, OGD 条件下の培養 NS/PC を用い, 増殖能および多分化能へ及ぼす rPGRN の影響を検討した.

rPGRN 処置は OGD により惹起される細胞増殖効果をさらに上昇させた (Fig 9). また, rPGRN 処置は Akt および GSK-3β リン酸化レベルを増加させ, かつその下流に存在する β-catenin の非リン酸化体レベルを増加させたことから, この細胞増殖効果に PI3-K/Akt/GSK-3β 情報伝達系が関与していると示唆された. さらに, NS/PC の多分化能に対する rPGRN の影響を検討した結果, OGD 処置により神経細胞への分化能が増強されたものの, その増強は rPGRN 処置により変化しなかった. 同様に, アストロサイトへの分

化能も変化しなかった (Fig 10). 一方、興味深いことに rPGRN 処置は  $\beta$ 3-tubulin 陽性神経細胞の突起を伸長させることを示した.

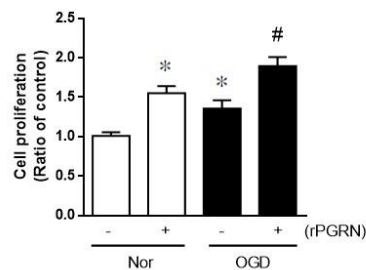


Fig. 9 Effect of rPGRN on OGD-induced cell proliferation.

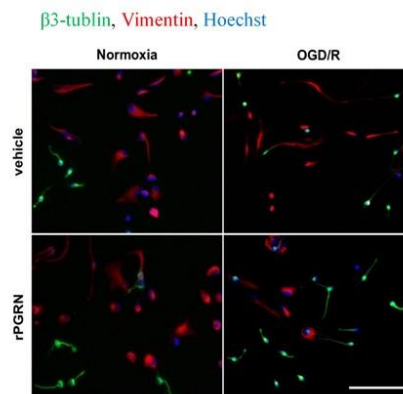


Fig. 10 Effect of rPGRN on cell differentiation.

## 総括

本研究では、脳梗塞後に誘導される PGRN の病態生理学的変化の一端を明らかにした. すなわち、シベレスタットによる好中球エラスターゼ活性の抑制は脳梗塞後の PGRN 切断抑制を介した多面的な脳保護効果を示すことを明らかにした.さらに、PGRN は虚血後早期の炎症を抑制し、また NS/PC に直接作用することで、その増殖能を増強させ、分化後の神経突起伸長作用を有する可能性があるため、脳梗塞後の神経学的機能の回復にも寄与する可能性を示した.

## 【研究成果の掲載雑誌】

Horinokita I, Hayashi H, Oteki R, Mizumura R, Yamaguchi T, Usui A, Yuan B and Takagi N.

Int. J. Mol. Sci, 20 (20): 5210 (2019).

## 論文審査の結果の要旨

脳梗塞は種々の後遺症を引き起こすことから、要介護認定を受ける患者数が多い疾患である。現在、脳梗塞急性期の治療では血栓溶解薬の組織プラスミノゲンアクチベータが著効を示す一方で、副作用を避けるために脳梗塞発症後の投与開始時間が制約され、治療の対象となる患者は限られている。このため脳梗塞急性期における有効な治療薬の開発が急務とされている。

**Progranulin (PGRN)** は糖タンパク質成長因子の一種であり、組織修復および炎症抑制など種々の機能を有することが知られている。近年、**PGRN** の神経細胞保護因子としての役割が注目されている一方で、その **PGRN** が好中球エラスターゼ (NE) により切断されて生じる **granulin (GRN)** は翻って炎症を誘導することが報告されている。炎症性サイトカインの産生等に基づく脳梗塞急性期の複雑な病態に鑑みて、**PGRN** の病態生理学的役割を明らかにすることは、新たな治療法を見出すうえで重要事項であると考えられる。そこで本研究では、脳梗塞病態下での **PGRN** および **GRN** の役割について検討し、新たな脳梗塞治療戦略の提案を試みた。

第1章では、ラット脳梗塞モデルおよび初代培養ミクログリアを用いて虚血性脳障害時の **PGRN** および **GRN** の病態生理学的変化について検討するとともに、**NE** の選択的阻害薬シベレスタットの **PGRN** 切断および炎症性サイトカイン発現に及ぼす影響、さらに細胞障害に及ぼす効果について検討した。その結果、脳梗塞後の **PGRN** タンパク質量は3日目まで増加し続け、かつ **Iba-1** 陽性活性化ミクログリアでそれらは発現していた。これを裏付けるように、**oxygen-glucose deprivation (OGD)** 処置後の初代培養ミクログリアでも同様に、活性化ミクログリアにおいて **PGRN** が発現していた。さらに、**GRN** タンパク質量は **ME** 後1日目から増加していたことから、虚血後早期から **PGRN** の切断が惹起されていると考えられた。そこで好中球エラスターゼ選択的阻害薬シベレスタットの効果をモデル動物で検討した結果、**PGRN** 量はさらに増加し、一方で **GRN** 量の増加は抑制された。さらにシベレスタット投与は、脳梗塞後の脳内に浸潤する好中球数には影響しないものの、エラスターゼ活性および炎症性サイトカインの **mRNA** 量を抑制するとともに、脳梗塞後に増加する **TUNEL** 陽性細胞数を減少させた。

第2章では、シベレスタットの抗炎症作用や細胞保護効果が直接的な効果によるものかをシベレスタットおよび **recombinant PGRN (rPGRN)** を用い、各脳細胞に焦点をあて検討した。その結果、第1章で示したシベレスタットの細胞保護効果は脳梗塞後の好中球エラスターゼの阻害により切断を逃れた **PGRN** による間接的な寄与が大きいと示唆された。さらに、ミクログリアへの **rPGRN** 処置は、**M1** ミクログリアのマーカーである **iNOS** 陽性細胞数を減少させたが、**Iba-1** 陽性ミクログリアの数を変化させなかった。このことから、**PGRN** はミクログリアをラミファイド型または **M2** ミクログリアに極性を転換させ、細胞保護効果の一端を担っていると考えられた。

第3章では、**OGD** 条件下の培養神経幹/前駆細胞 (**NS/PC**) を用い、それらの増殖能および多分化能へ及ぼす **rPGRN** の影響を検討した。その結果、**rPGRN** は **OGD** により惹起される細胞増殖効果をさらに上昇させた。さらに、**rPGRN** の細胞増殖効果に **PI3-K/Akt/GSK-3 $\beta$**  情報伝達系が関与する可能性を示した。一方、**OGD** 処置により神経細胞への分化能が増強されたものの、その増強

は rPGRN 処置により変化しなかった。また、rPGRN 処置は  $\beta$ 3-tubulin 陽性神経細胞の突起を伸長させることが明らかとなった。

以上、本研究では脳梗塞後の PGRN に着目し、その病態生理学的役割の一端を明らかにした。すなわち、好中球エラスターゼ活性の抑制は脳梗塞後の PGRN 切断抑制を介した多面的な脳保護効果を発揮することを示した。これらの研究結果は複雑な脳梗塞病態の一端を明らかにし、かつ新たな作用機序による脳梗塞治療薬の開発に有益な知見を与えるものといえる。したがって、本申請論文は、博士（薬学）の学位論文として相応しいものと判断する。